

University of Groningen

Enantioselective biocatalytic conversions of epoxides

Lutje Spelberg, Jeffrey Harald

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2003

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Lutje Spelberg, J. H. (2003). *Enantioselective biocatalytic conversions of epoxides*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

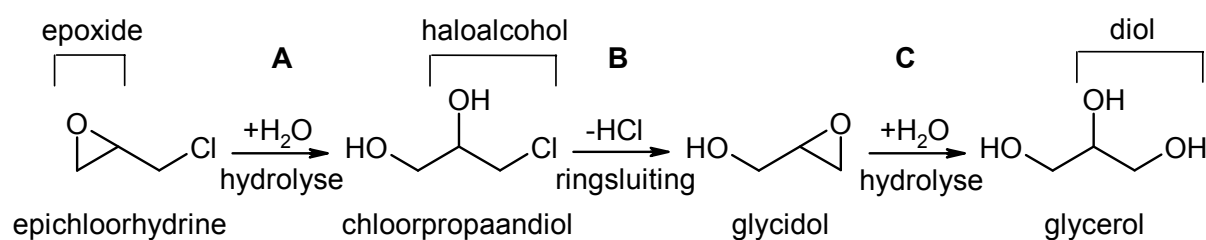
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Een aantal van door de mens gemaakte chemische stoffen komt terecht in het milieu, zoals in de bodem en het oppervlaktewater. Doordat veel van deze verbindingen nieuw zijn in het milieu, kunnen ze niet gemakkelijk worden afgebroken, waardoor het gevaar ontstaat dat ze weer in de voedselketen worden opgenomen. De natuur heeft dit probleem opgelost door middel van *microorganismen* die in staat zijn toxische verbindingen af te breken. De chemische omzettingen in een microorganisme worden uitgevoerd door *enzymen*. Enzymen zijn katalysatoren, ze kunnen chemische processen versnellen zonder daarbij zelf verbruikt te worden. Onderzoek heeft aangetoond dat enzymen chemische reacties tot wel 100.000.000.000 keer kunnen versnellen. In tegenstelling tot veel chemische processen doen enzymen dit onder milde condities zoals kamertemperatuur en atmosferische druk.

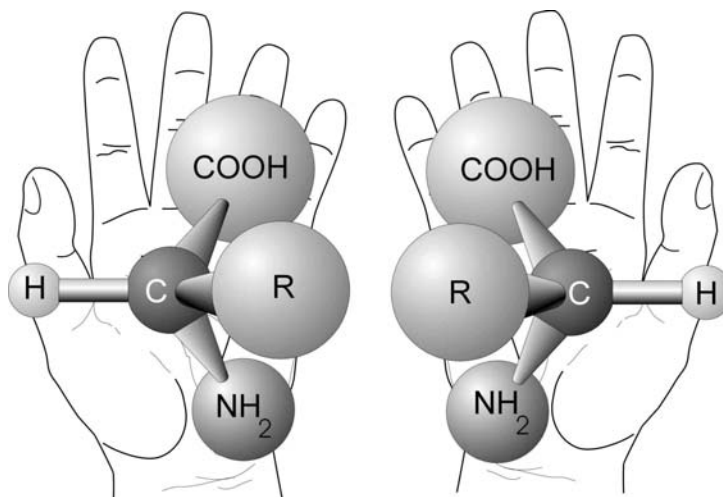
Gehalogeneerde verbindingen zoals 1,2-dichloorethaan, chloroform en epichloorhydrine (Figuur 1) worden door de chemische industrie gebruikt als o.a. oplosmiddel, koelvloeistof, insecticide, of als bouwsteen voor de bereiding van een variëteit aan chemische verbindingen. Eind jaren '80 is door A. van den Wijngaard, een AIO in de onderzoeksgroep van professor D. B. Janssen, uit oppervlaktewater dat is vervuild met gechloreerde verbindingen een microorganisme geïsoleerd. Deze bacterie is in staat om het giftige epichloorhydrine om te zetten in het niet-giftige glycerol (Figuur 1). In de eerste stap (A) wordt epichloorhydrine (een epoxide) omgezet naar chloorpropaandiol (een haloalcohol). Deze reactie is een *hydrolyse* en wordt gekatalyseerd door een *epoxide hydrolase*. In de tweede stap wordt het gevormde haloalcohol omgezet naar een epoxide. Deze stap is een *ring-sluiting* en wordt gekatalyseerd door een *haloalcohol dehalogenase*. In de derde stap wordt het gevormde epoxide gehydrolyseerd naar het niet-toxische glycerol.



Figuur 1 Afbraakroute van epichloorhydrine door de bacterie *A. radiobacter AD1*. Stappen (A) en (C) worden gekatalyseerd door een epoxide hydrolase en stap (B) door een haloalcohol dehalogenase.

Sommige enzymen zijn in staat *chirale* moleculen op een *enantioselectieve* manier af te breken. Dit aspect blijkt bijzonder goed toepasbaar te zijn voor de bereiding van chirale biologisch actieve stoffen zoals medicijnen. Chiraliteit betekent dat objecten of moleculen in twee verschillende varianten voorkomen. Een voorbeeld van chirale objecten zijn handen. De

linkerhand en de rechterhand zijn spiegelbeelden van elkaar, maar ze zijn niet zodanig te draaien dat ze elkaar overlappen (Figuur 2).



Figuur 2 Chiraliteit van handen en moleculen.¹

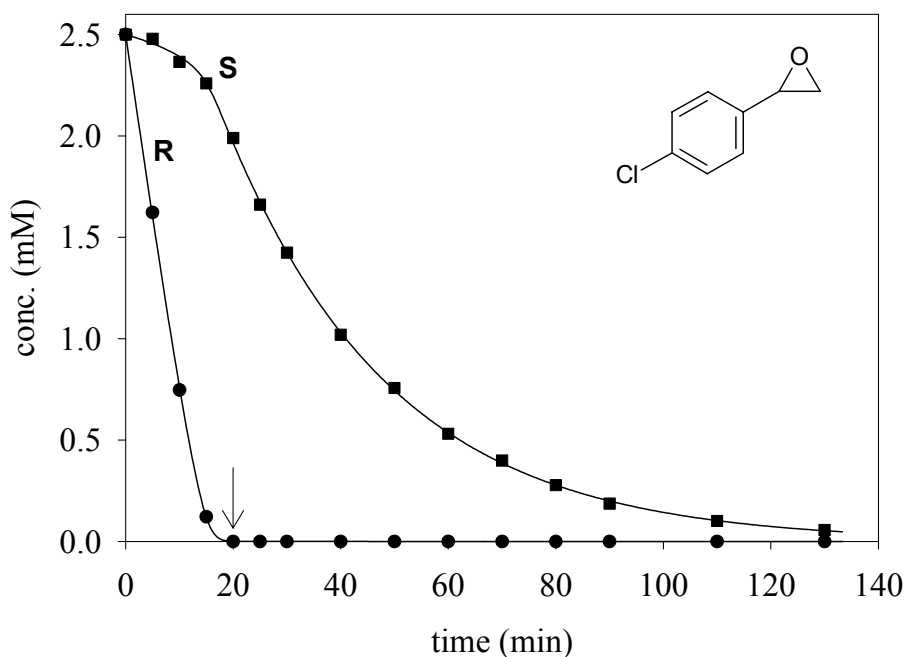
De twee varianten van een chiraal molecuul, aangeduid met (*R*) en (*S*), worden *enantiomeren* genoemd. Als maar één enantiomeer aanwezig is, wordt de verbinding *enantiomeer zuiver* genoemd. Als beide enantiomeren evenredig aanwezig zijn, is de verbinding *racemisch*. Een manier om een enantiomeer zuivere verbinding te maken is door middel van een *kinetische resolutie*: de *enantioselectieve* omzetting van één van beide enantiomeren in een racemisch mengsel. Enantiomeer zuivere epoxiden en haloalcoholen zijn bouwstenen voor de bereiding van fijnchemicaliën.

Het doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek is de bereiding van enantiomeer zuivere epoxiden en derivaten daarvan door gebruik te maken van enzymen die aanwezig zijn in *Agrobacterium radiobacter* AD1. Deze enzymen, die zijn geëvolueerd voor het afbreken van toxische chemische stoffen, zouden toegepast kunnen worden voor de bereiding van hoogwaardige fijnchemicaliën. Het onderzoeken van enzymatische omzettingen vereist kennis van zowel de biotechnologie als de organische chemie. Daarom werd dit onderzoek uitgevoerd als een samenwerking tussen de onderzoeksgroepen van professor D. B. Janssen (biotechnologie) en professor R. M. Kellogg (organische chemie). De belangrijkste resultaten worden nu per hoofdstuk besproken. Hoofdstuk 1 is een inleiding, waarin o.a. de eigenschappen van de twee enzymen en van soortgelijke enzymen wordt besproken. Hoofdstuk 8 is een samenvatting en discussie van de in de hoofdstukken 2 t/m 7 beschreven resultaten.

¹ Sarfati, J. "Origin of Life: The Chirality Problem," *Creation Ex Nihilo Technical Journal* **1998**, 12, 263

Hoofdstuk 2 Enantioselectiviteit van een epoxide hydrolase uit *Agrobacterium radiobacter*

In Hoofdstuk 2 wordt het onderzoek naar de enantioselectiviteit van het epoxide hydrolase van *A. radiobacter* AD1 beschreven. Hieruit blijkt dat alleen epoxiden met een *aromatische* ring door het enzym met een matige tot hoge enantioselectiviteit worden omgezet in diolen. In Figuur 3 is de kinetische resolutie van het aromatische epoxide *para*-chloorstyreenoxide weergegeven. In deze reactie wordt het (*R*)-enantiomeer van het epoxide veel sneller omgezet dan het (*S*)-enantiomeer. Als de reactie na 20 minuten wordt gestopt (pijl), kan het achterblijvende (*S*)-enantiomeer worden geïsoleerd. Dezelfde methode werd ook met een aantal andere aromatische epoxiden herhaald, waardoor het mogelijk was om alle (*R*)-enantiomeren zuiver in handen te krijgen.



Figuur 3 *Kinetische resolutie van para-chloorstyreenoxide gekatalyseerd door het epoxide hydrolase uit A. radiobacter AD1.*

De opbrengst van het achterblijvende enantiomeer wordt bepaald door de enantioselectiviteit van de enzymatische reactie. Is de enantioselectiviteit erg hoog dan wordt het achterblijvende enantiomeer niet omgezet en kan in een opbrengst van maximaal 50% worden verkregen. De opbrengsten van 27% tot 36% (Hoofdstuk 2, tabel 1) van de geteste epoxiden geven dus aan dat de enantioselectiviteit nog niet optimaal is.

Hoofdstuk 3 Biokatalytische toepassingen van het epoxide hydrolase van *Agrobacterium radiobacter* AD1 en een mutant met verhoogde enantioselectiviteit

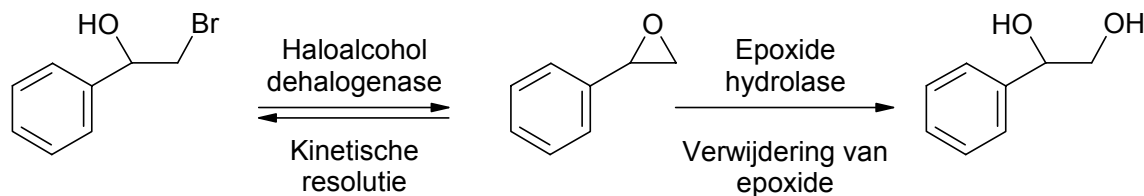
In hoofdstuk 3 is de enantioselectiviteit van het epoxide hydrolase in de omzetting van een reeks van epoxiden in meer detail onderzocht door enzymatische omzettingen uit te voeren met de (*R*)-enantiomeren en (*S*)-enantiomeren afzonderlijk. Deze verbindingen zijn vrij lastig te bereiden en daarom zijn deze metingen uitgevoerd in Frankrijk, in samenwerking met de werkgroep van professor R. Furstoss. Naast het voordeel dat de Universiteit van Marseille op minder dan 5 kilometer van het strand af ligt, is in deze groep een dergelijk onderzoek eerder uitgevoerd met een ander epoxide hydrolase. Uit de resultaten komt naar voren dat het mogelijk is dat de enantiomeren van styreenoxide-derivaten op verschillende manieren door het enzym worden omgezet. Voor een goed gefundeerd bewijs van deze hypothese is in de toekomst meer onderzoek nodig.

Intussen was door andere onderzoekers het werkingsmechanisme (R. Rink) en de kristalstructuur (M. Nardini) van het epoxide hydrolase bepaald. Hieruit blijkt dat als een bepaald aminozuur (tyrosine 215) wordt vervangen, de enantioselectiviteit van het enzym hoger wordt. In een uitgebreid onderzoek, beschreven in dit hoofdstuk, blijkt dat dit met name voor aromatische verbindingen het geval is. Een tweede voordeel van dit veranderde enzym is dat de achterblijvende (*S*)-enantiomeren bijna niet meer worden omgezet, waardoor dit enzym geschikter is voor gebruik in de organische chemie.

Hoofdstuk 4 Een tandem enzym reactie voor de synthese van optisch actieve haloalcoholen, epoxiden en diolen

De Hoofdstukken 4 t/m 7 beschrijven enzymatische omzettingen met het tweede enzym uit *A. radiobacter* AD1: het haloalcohol dehalogenase. In Hoofdstuk 4 is de enantioselectiviteit van de omzettingen van haloalcoholen naar epoxiden beschreven. Het blijkt dat, in tegenstelling tot omzettingen met het epoxide hydrolase, zowel aromatische als niet-aromatische moleculen met een gemiddelde tot hoge enantioselectiviteit worden omgezet. Het probleem is dat zowel de omzetting van het haloalcohol naar het epoxide als de omgekeerde reactie plaatsvindt. Hierdoor bereikt de reactie op een bepaald moment een evenwichtstoestand waardoor de omzetting stopt en de achterblijvende verbinding niet enantiomeer zuiver kan worden verkregen. Dit probleem is opgelost door het epoxide direct na vorming om te zetten naar een diol. Hierdoor kan de omgekeerde reactie niet plaatsvinden en kan het achterblijvende enantiomeer van het haloalcohol enantiomeer zuiver worden verkregen. Voor het omzetten van het epoxide naar het diol wordt gebruik gemaakt van het epoxide hydrolase. Dit enzym wordt alleen toegevoegd om de ring-sluiting van het haloalcohol te versnellen, het heeft geen invloed op de enantioselectiviteit. Het gezamenlijk

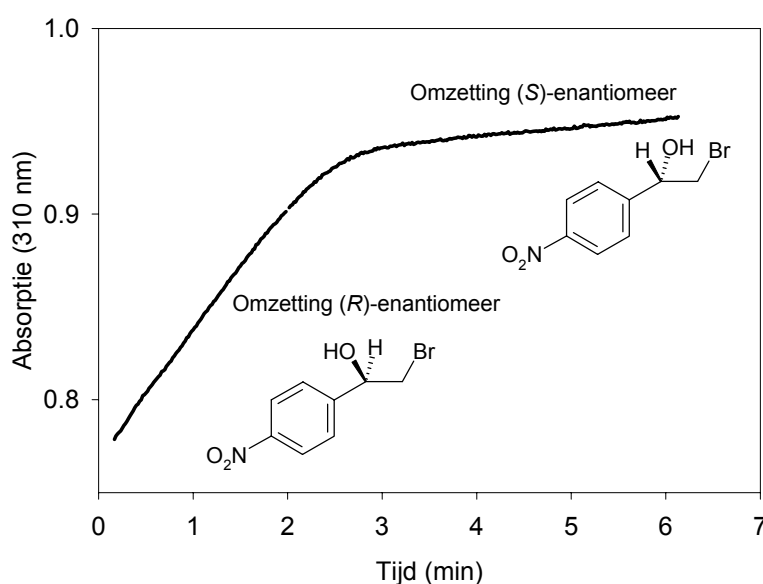
gebruik van deze twee enzymen om haloalcoholen enantiomeer zuiver te verkrijgen is de "tandem enzymreactie" genoemd



Figuur 4 De tandem enzym reactie.

Hoofdstuk 5 Verkenning van biokatalytische toepassingen van een haloalcohol dehalogenase door gebruik te maken van chromogene substraten

Dit hoofdstuk beschrijft het onderzoek naar de mogelijke reacties die het haloalcohol dehalogenase kan katalyseren. Omdat honderden reacties in aanmerking komen, is er gebruik gemaakt van een *chromogeen* substraat: een haloalcohol dat bij omzetting een epoxide oplevert met een andere kleur of kleurintensiteit. Door dit te meten met behulp van een *spectrofotometer* is het mogelijk de enzymatische omzettingen op een eenvoudige manier te volgen. Als de omzetting enantioselectief is, kan dit worden waargenomen doordat er een knik in de curve aanwezig is (Figuur 5).

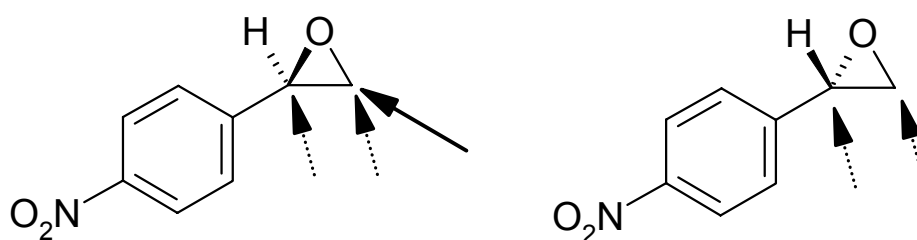


Figuur 5 Enantioselectieve omzetting van para-nitro-2-bromo-1-phenylethanol door het haloalcohol dehalogenase van *A. radiobacter* AD1.

In Hoofdstuk 4 is beschreven dat het enzym ook de teruggaande reactie, de ring-opening van het epoxide door bromide-ionen (Br^-) katalyseert. De vraag was of ook andere *nucleofielen* (reactieve moleculen) worden geaccepteerd door het haloalcohol dehalogenase. De omzetting van een veelvoud aan nucleofielen is getest met beide enantiomeren van het epoxide. Hieruit blijkt dat behalve de natuurlijke nucleofielen Br^- en Cl^- , ook de nucleofielen azide (N_3^-), nitriet (NO_2^-) en cyanide (CN^-) worden geaccepteerd. Dit maakt het mogelijk een breed scala aan enantiomeer zuivere producten te maken uitgaande van epoxiden.

Hoofdstuk 6 Enantioselectieve en regioselectieve biokatalytische azidolyse van aromatische epoxiden

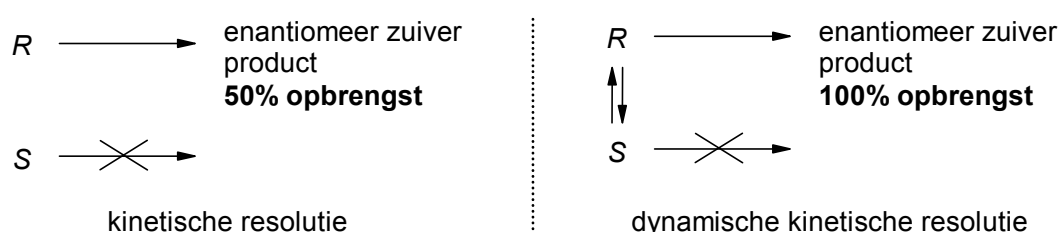
In dit hoofdstuk is de azidolyse, de ring-opening van epoxiden door azide (N_3^-) resulterende in azidoalcoholen, in meer detail beschreven. De enzymatische omzetting heeft, in tegenstelling tot een "normale" chemische reactie, een hoge mate van enantioselectiviteit en regioselectiviteit, waardoor het azidoalcohol met hoge enantiomere zuiverheid wordt gevormd (Figuur 6). Naast de enzymatische reactie, vindt ook de chemische reactie met de beide enantiomeren van het epoxide en azide plaats (Figuur 6). Bij het uitvoeren van een reactie op grotere schaal (0.5 gram) resulteert dit in de vorming van meerdere ongewenste nevenproducten. Door het azide langzaam toe te druppelen en het epoxide als vaste fase toe te voegen, resulteerde een kinetische resolutie uitgevoerd op grotere schaal in de vorming van het azidoalcohol in een goede opbrengst en enantiomere zuiverheid. Deze azidoalcoholen kunnen chemisch verder worden omgezet naar biologisch actieve aminoalcoholen die worden toegepast in de bereiding van farmaceutische stoffen zoals medicijnen.



Figuur 6 *Regioselectiviteit en enantioselectiviteit van de chemische ring-opening door azide. Slechts één van de vier mogelijke chemische reacties (onderbroken pijl) wordt ook gekatalyseerd door het haloalcohol dehalogenase (vaste pijl).*

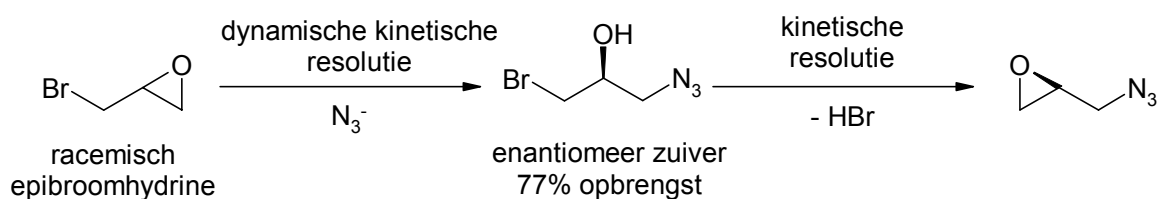
Hoofdstuk 7 Enzymatische dynamische kinetische resolutie van epihalohydrines

Een beperking van de in de voorgaande hoofdstukken beschreven kinetische resoluties is dat de maximale opbrengst van het achterblijvende enantiomeer slechts 50% is. Bij een *dynamische kinetische resolutie* wordt het achterblijvende enantiomeer voortdurend geracemiseerd, wat betekent dat het wordt omgezet in een mengsel van beide enantiomeren. Hierdoor kan een volledige omzetting plaatsvinden en kan theoretisch het gevormde product in een opbrengst van 100% worden geïsoleerd.



Figuur 7 Principe van een kinetische en een dynamisch kinetische resolutie.

De racemisatie van het epihalohydrine, gecombineerd met de enantioselectieve ring-opening door N_3^- , resulteert in een enzymatische dynamische kinetische resolutie. Bij gebruik van epichloorhydrine als substraat is de snelheid van racemisatie langzamer dan de snelheid van ring-opening. Met epibroomhydrine als substraat is de racemisatie sneller hetgeen resulteert in de vorming van het azidoalcohol in 84% opbrengst en 94% enantiomere zuiverheid. Door een gelijktijdige enantioselectieve kinetische resolutie van dit azidoalcohol kan het enantiomeer zuiver en in 77% opbrengst worden verkregen.



Figuur 8 Gecombineerde kinetische en dynamisch kinetische resolutie.

Conclusie

Dit proefschrift beschrijft de biokatalytische eigenschappen en mogelijkheden van het epoxide hydrolase en het haloalcohol dehalogenase uit *A. radiobacter* AD1. Nieuwe biokatalytische routes voor de bereiding van enantiomeer zuivere epoxiden, haloalcoholen,

diolen en azidoalcoholen zijn beschreven. Doordat het onderzoek is uitgevoerd in het kader van het IOP katalyse programma is er een sterke focus geweest op het ontwikkelen van biokatalytische reacties die een industriële relevantie hebben. Vanwege de potentiële toepasbaarheid van de beschreven reacties zijn een drietal octrooien ingediend. Het epoxide hydrolase wordt binnenkort commercieel beschikbaar. De patentaanvraag beschrijvende de ring opening van epoxiden door de diverse nucleofielen is door de onderzoeker gekocht en zal in een onderneming worden ingebracht die de industriële toepassingen van de beschreven enzymen en reacties zal gaan commercialiseren.